

УДК 577.359/57.053:57.042:57.041

М. Мельник, асп., В. Мартинюк, д-р біол. наук, О. Артеменко, канд. біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ СЛАБКИХ НАДНИЗЬКОЧАСТОТНИХ ЕЛЕКТРОМАГНІТНИХ ПОЛІВ НА СИНТЕЗ NO В ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИНАХ

Досліджено дію наднизькочастотного електромагнітного поля 8 Гц 25 мкТл на синтез NO в гладеньком'язових клітинах шлунку щурів під час їх стимуляції K⁺-деполяризацією. Показана відсутність впливу електромагнітного поля 50 Гц 25 мкТл на синтез NO в стимульованих K⁺-деполяризацією клітинах, та в клітинах у стані спокою. Показано відсутність впливу електромагнітного поля 8 Гц 25 мкТл на рівень NO в клітинах у стані спокою і активацію синтезу NO при збудженні гладеньком'язових клітин гіперкалієвим розчином. Факт активуючої дії електромагнітного поля 8 Гц 25 мкТл на продукцію NO дозволяє пояснити раніше встановлений феномен пригнічення K⁺-індукованого скорочення гладеньких м'язів.

Ключові слова: електромагнітне поле, синтез NO, гладеньком'язові клітини.

Вступ. Гладенькі м'язи являють собою невід'ємну структурну та функціональну частину нашого організму. Регуляція їх активності відповідає за тонус кровоносних судин, за перистальтику та скоротливу діяльність травного тракту, за скорочення сечового міхура, матки та проток сечостатевої системи. Для здійснення цієї регуляції необхідні певні агенти, що проникаючи крізь клітинну мембрану, або приєднуючись до відповідних рецепторів, викликають каскади сигнальних шляхів, які, в свою чергу, впливають на скоротливі білки і викликають або скорочення, або розслаблення гладеньком'язових клітин (ГМК). Одним із фізіологічно важливих факторів розслаблення гладеньких м'язів є монооксид азоту (NO). Роль цієї молекули та її сигнальні шляхи є на сьогодні відомими. За синтез NO відповідають NO-синтази (NOS) [8]. В залежності від місця та функцій розрізняють три типи NOS: ендотеліальна NOS (eNOS), нейрональна NOS (nNOS) та індукцйбельна (iNOS), що активується у відповідь на запальні процеси та знаходиться в більшій степені в імунних клітинах. Окрім цього відомо, що NO може синтезуватись й іншими клітинами, зокрема ГМК [2, 8]. При цьому, eNOS та nNOS являються Ca²⁺- та кальмодулін-залежними, а iNOS – незалежними від них.

Останнім часом не зменшується інтерес щодо впливу електромагнітних полів різних частотних діапазонів на біологічні процеси. На цей час існує великий масив даних, який свідчить про біологічну дію слабких наднизькочастотних електромагнітних полів (ННЧ ЕМП) [6]. В попередній роботі [14] було показано, що слабкі ННЧ ЕМП можуть змінювати концентрацію внутрішньоклітинного кальцію в ГМК шлунку щурів. Але, наразі, механізм впливу ЕМП на ГМК залишається не відомим. Останнім часом з'являються дані, які показують збільшення рівня синтезу NO в різних клітинах внаслідок дії ННЧ ЕМП на NOS. Зокрема, показано, що дія ЕМП частотою 50 Гц та індукцією 1 мТл збільшувала синтез NO в ендотеліальних клітинах пупочної вени людини [7]. Також було продемонстровано, що ННЧ ЕМП частотою 60 Гц, 2 мТл активувало nNOS мозку щурів та, відповідно, збільшувало синтез NO [1]. Інші дослідження показали, що ННЧ ЕМП збільшували експресію eNOS та iNOS в людських кератиноцитах лінії HaCaT [9]. Крім того було показано, що ННЧ ЕМП (60 Гц, 0,1 мТл) викликали підвищення активності NOS в печінці щурів [12]. Окрім цього у попередніх дослідженнях показано, що ННЧ ЕМП пригнічують амплітуду скорочення гладенького м'язу травного тракту, викликаного K⁺-деполяризацією ГМК [15]. Через це ціка-

вим є питання про можливість ННЧ ЕМП впливати на синтез NO в ГМК.

Отже, враховуючи вище зазначене **метою роботи** було з'ясування особливостей впливу ННЧ ЕМП різних частот на рівень синтезу NO в ГМК шлунку щурів у стані спокою та при стимуляції гіпертонічним розчином хлориду калію (80 mM KCl).

Матеріали і методи. В експериментах використовувались нелінійні білі щури. Тварини утримувались в стандартних умовах віварію ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Для експерименту брали тварин вагою близько 250 г. Щурів швидко декапітували та вилучали шлунок для подальших досліджень. Вся робота проводилась відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Шлунок розтинали по великій кривизні, промивали в розчині нормального Кребсу та відчищали від сполучних тканин. Відчищену гладеньком'язову тканину звільняли від залишків розчину Кребса за допомогою фільтрувального паперу та зважували. В розчині Кребсу тканину нарізали на дрібні шматочки розміром близько 2x2 мм. Потім поміщали їх в бюкс з 5 мл розчину Кребса з додаванням L-аргініну (1,74 мг на 1 мл розчину) та залишали на 30 хв.

Вимірювання концентрації NO проводили з використанням реактиву Грісса. За основу було взято метод спектрофотометричного визначення рівня метаболітів NO в біологічних зразках [13]. Розчин реактиву Грісса готували розчиненням сухого реактиву Грісса в співвідношенні 1:1 у 12% оцтовій кислоті. Для визначення концентрації NO вміст бюксу зі зразками тканини обережно перемішували піпеткою з оплавленим кінчиком і потім давали випасти шматочкам тканини в осад. Відбирали 1,5 мл надосадного розчину в кювету та додавали до нього 1,5 мл розчину реактиву Грісса. Розчини перемішували та залишали на 12 хв в темряві. Після цього інтенсивність кольору розчинів вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 на довжині хвилі 540 нм. Спектрофотометричним контролем був розчин реактиву Грісса змішаний з водою у співвідношенні 1:1. Отримані дані оптичної густини D перераховували у концентрацію NO (М/л) шляхом лінеаризації за попередньо отриманою калібрувальною кривою з використанням KNO₂ (рис. 1). Калібрувальна крива мала класичний S-подібний вигляд. У подальшому значення концентрації NO нормували на масу тканини шлунку експериментальної тварини (NO, М/(л*г тканини)).

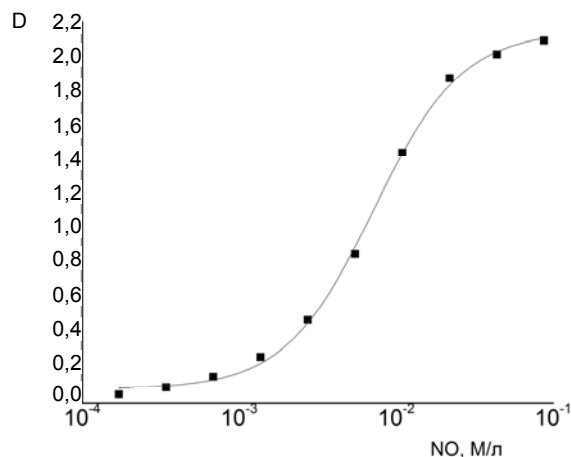


Рис. 1. Калібрувальна крива для визначення концентрації NO

Для вимірювання концентрації NO під час гіперкалієвої деполяризації в бюкс зі зразками тканини додавали розчин 80 мМ KCl та залишали так на 15 хв. Потім, за зазначеною вище схемою, відбирали 1,5 мл розчину з бюксу та проводили спектрофотометричне вимірювання.

Електромагнітне поле наднизьких частот генерували за допомогою котушок Гельмгольца та генератора Г6-28. Вектор індукції електромагнітного поля, що створювалось кільцями Гельмгольца, був паралельним вертикальній компоненті геомагнітного поля. Бюкси зі зразками м'язової тканини піддавали впливу імпульсного електромагнітного поля частотою 8 або 50 Гц з індукцією 25 мкТл. Час експозиції складав 15 хв. Далі, проводили спектрофотометричний аналіз за зазначеною ви-

ще схемою. Вибір частот 8 і 50 Гц був обумовлений їх біологічною активністю [6], в тому числі і по відношенню до гладеньких м'язів [14, 15].

Статистичну обробку результатів здійснювали загальноприйнятим методом дисперсійного аналізу ANOVA [16].

Результати та їх обговорення. На рисунку 2 наведено результати дослідження впливу електромагнітного поля різних частот і гіперкалієвого розчину та комбінації цих факторів на продукцію NO гладеньком'язовою тканиною шлунку щурів. Як видно, вплив електромагнітного поля як частотою 8 Гц, так і 50 Гц практично не впливав на утворення NO в гладеньких м'язах, які знаходились у стані спокою (рис. 2А і 2Б).

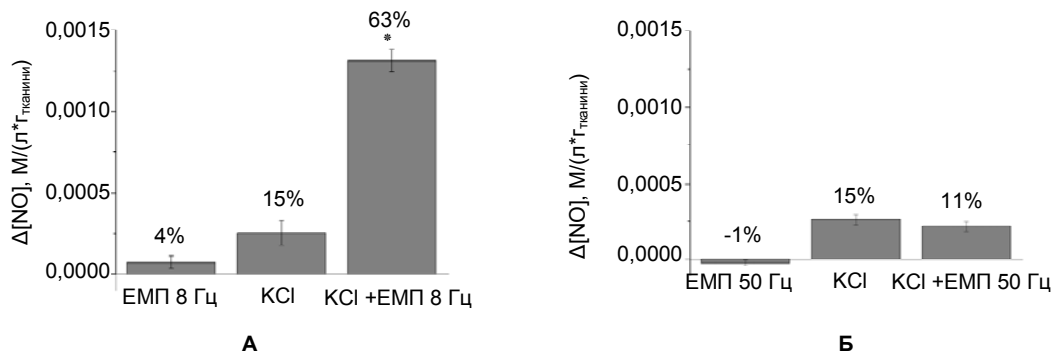


Рис. 2. Зміна концентрації NO в ГМК під дією ЕМП з частотою 8 Гц (А) і 50 Гц (Б) при аплікації 80 мМ KCl та при комбінованій дії ЕМП й 80 мМ KCl у порівнянні з контролем

Примітки: за "0" прийнято контрольні значення; * – $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Збудження гладеньком'язових клітин гіперкалієвим розчином не призводило до достовірних змін продукції NO, але спостерігалась певна тенденція до зростання його концентрації, що відтворювалось у повторних дослідженнях (рис. 2). Наявність цієї тенденції скоріше за все свідчить про слабку стимуляцію синтезу NO при гіперкалієвій деполяризації гладеньком'язових клітин, але зміни продукції NO за короткий час інкубації в нашому експерименті були малими і знаходились на межі чутливості експерименту. Щодо вказаної тенденції варто відмітити, що активацію синтезу NO при збудженні гладеньком'язових клітин спостерігали різні дослідники, при чому стимуляцію викликали різними чинниками – естрогеном [10], АТФ [10], активацією Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів малої та середньої провідності (SK_{Ca} - та IK_{Ca} -канали, відповідно) [11].

Під час K^+ -деполяризації активуються потенціал керувані натрієві та кальцієві канали. Відкриття кальцієвих каналів призводить до стрімкого збільшення внут-

рішньоклітинної концентрації кальцію. Окрім того, збільшення концентрації кальцію внаслідок активації потенціал керуванних кальцієвих каналів викликає цілий каскад регуляторних реакцій. Паралельно запускається механізм кальцій-індукованого вивільнення кальцію із саркоплазматичного ретикулу. Все це у свою чергу призводить до ініціації скорочення ГМК та активації продукції NO, що є одним з механізмів обмеження скорочення і подальшої релаксації ГМК [5, 8].

Вплив імпульсного електромагнітного поля частотою 8 Гц 25 мкТл достовірно на 64% порівняно з контролем підвищував продукцію NO в гладеньких м'язах, які були стимульовані додаванням гіперкалієвого розчину (рис. 2А). На цей час добре відомо, що NO пригнічує скоротливу активність гладеньких м'язів [8]. Таким чином, отримані в даній роботі результати в цілому збігаються з раніше проведеними тензометричними дослідженнями на гладеньком'язових смужках сліпої киш-

ки щурів, в яких показано пригнічуючу дію електромагнітного поля частотою 8 Гц 25 мкТл на індуковані ацетилхоліном і гіперкалієвим розчином скорочення гладеньких м'язів [15]. Наведені факти свідчать про залучення NO-залежних шляхів регуляції в клітинних механізмах дії електромагнітних полів. NO є одним з головних факторів вазодилатації, ця сигнальна молекула також відіграє роль агента релаксації в ГМК травного тракту. Відомо, що NO синтезується ферментами NOS [2, 8]. Мала молекула монооксиду азоту здатна легко проникати крізь мембрану клітин. NO вважається ідеальною релаксуючою сигнальною молекулою, оскільки викликає швидке розслаблення гладеньких м'язів, бо проникає крізь мембрану не потребуючи спеціальних переносників чи мембранних рецепторів. Після проникнення в клітину, монооксид азоту активує гуанілатциклазу, яка синтезує цГМФ із ГТФ. Збільшення рівня цГМФ активує, в свою чергу, протеїнкіназу G, яка відкриває Ca^{2+} -залежні K^{+} -канали великої провідності (BK_{Ca}-канали). Падіння концентрації внутрішньоклітинного кальцію призводить до інактивації кінази легких ланцюгів міозину, що згодом призводить до розслаблення ГМК [2]. З іншого боку, результати досліджень окремих дослідницьких груп, отримані на моделях гранулярних клітин мозочка щурів, свідчать про активуючий вплив низькочастотних магнітних полів (50 Гц, 1 мТл) на потенціал керовані натрієві канали [4]. Цей вплив дослідники пов'язують з системою синтезу простагландинів E₂, в якій чутливою ланкою скоріше за все є циклооксигенази-2. А експресія цих ферментів, як було показано, запускається активними формами кисню [3].

У дослідженнях впливу електромагнітного поля частотою 50 Гц 25 мкТл достовірних змін у продукції NO не виявлено (рис. 2Б). Виходячи з теоретичних уявлень про механізми дії NO, можна очікувати стимулюючу дію електромагнітного впливу на частоті 50 Гц на скорочення гладеньких м'язів, що варто експериментально верифікувати у подальших дослідженнях.

Висновки. Отримані результати показують, що ННЧ ЕМП частотою 8 і 50 Гц 25 мкТл не впливають на продукцію NO в гладеньких м'язах, що знаходяться у стані спокою. Дія ННЧ ЕМП частотою 8 Гц при K^{+} -деполяризації ГМК викликає достовірне збільшення синтезу NO, тоді як ЕМП частотою 50 Гц не є ефективною, що свідчить про наявність вираженої частотної залежності біологічної ефективності ЕМП. Факт підвищення продукції NO при K^{+} -деполяризації ГМК свідчить про залученість NO-залежних шляхів внутрішньоклітин-

ної регуляції в механізмах біологічної дії електромагнітних полів наднизької частоти на гладенькі м'язи.

Список використаних джерел

1. S. I. Cho, Y. S. Nam, L. Y. Chu, and other. Extremely low-frequency magnetic fields modulate nitric oxide signaling in rat brain // Bioelectromagnetics. – October 2012. – Vol. 33, Issue 7. – P. 568–574.
2. R. K. Dubey, D. G. Gillespie and E. K. Jackson. Cyclic AMP-Adenosine Pathway Induces Nitric Oxide Synthesis in Aortic Smooth Muscle Cells // Hypertension. – 1998. – № 31. – P. 296–302.
3. Feng L., Xia Y., Garcia G.E., Hwang D., Wilson C.B. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide // J Clin Invest. – 1995, Apr. – Vol. 95, № 4. – P. 1669–75.
4. He Y.-L., Liu D.-D., Fang Y.-J., Zhan X.-Q., Yao J.-J., Mei Y.-A. Exposure to Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields Modulates Na^{+} Currents in Rat Cerebellar Granule Cells through Increase of A A/PGE_2 and EP Receptor-Mediated cAMP/PKA Pathway // PLOS ONE. – January 2013. – Vol. 8, Issue 1. – P. 1–13.
5. Karaki H., Ozaki H., Hori M., and other. Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle // Pharmacological Reviews. – 1997. – Vol. 49, № 2.
6. V.S. Martynyuk, Yu.V. Tseysslyer, N.A. Temuryants. Interference of the mechanisms of influence that weak extremely low frequency electromagnetic fields have on the human body and animals // Izvestiya, Atmospheric and Oceanic Physics. – 2012. – Vol. 48, № 8. – P. 832–846.
7. H. Miyata, K. Ishizawa, M. Ishido, K. Sugawara, M. Murase and T. Hondou. The effect of a 50-Hz sinusoidal magnetic field on nitric oxide (NO) production by human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) // Journal of Physics: Conference Series. – 2012. – № 344. – P. 1–9.
8. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells // FASEB J. – 1992. – № 6. – P. 3051–3064.
9. A. Patruno, P. Amerio, M. Pesce, and other. Extremely low frequency electromagnetic fields modulate expression of inducible nitric oxide synthase, endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in the human keratinocyte cell line HaCat: potential therapeutic effects in wound healing // British Journal of Dermatology. – February 2010. – Vol. 162, Issue 2. – P. 258–266.
10. Sheng J.Z., Arshad F., Braun J.E., Braun A.P. Estrogen and the Ca^{2+} -mobilizing agonist ATP evoke acute NO synthesis via distinct pathways in an individual human vascular endothelium-derived cell // Am J Physiol Cell Physiol. – 2008, Jun. – Vol. 294, № 6. – P. 1531–41.
11. Sheng J.Z., Braun A.P. Small- and intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels directly control agonist-evoked nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells // Am J Physiol Cell Physiol. – 2007, Jul. – Vol. 293, № 1. – P. 458–67.
12. T. Yoshikawa, M. Tanigawa, T. Tanigawa, and other. Enhancement of nitric oxide generation by low frequency electromagnetic field // Pathophysiology. – July 2000. – Vol. 7, Issue 2. – P. 131–135.
13. Мажитова М.В. Спектрофотометрическое определение уровня метаболитов монооксида азота в плазме крови и ткани мозга белых крыс // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 3.
14. Мельник М.І., Артеменко О.Ю., Мартинюк В.С. Вплив слабких низькочастотних електромагнітних полів на внутрішньоклітинну концентрацію кальцію гладеньком'язових клітин // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського, Серія "Біологія, хімія". – 2013. – Том 26 (65), № 2. – С. 123–132.
15. Цимбалюк О.В., Мартинюк В.С. Влияние магнитного поля крайне низкой частоты на вызванную K^{+} -деполяризацией и ацетилхолином сократительную активность интестинальных гладких мышц // Фізика живого. – 2011. – № 1. – С. 20–24.
16. Шеффе Г. Дисперсионный анализ, пер. с англ. – М., 1963.

Надійшла до редколегії 16.01.14

М. Мельник, асп., В. Мартинюк, д-р биол. наук, А. Артеменко, канд. биол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВЛИЯНИЕ СЛАБЫХ СВЕРХНИЗКОЧАСТОТНЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА СИНТЕЗ NO В ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ

Исследовано действие сверхнизкочастотного электромагнитного поля 8 Гц 25 мкТл на синтез NO в гладкомышечных клетках желудка крыс при их стимуляции K^{+} -деполяризацией. Показано отсутствие влияния электромагнитного поля 50 Гц 25 мкТл на синтез NO в стимулированных K^{+} -деполяризацией клетках, и в клетках в состоянии покоя. Показано отсутствие влияния электромагнитного поля 8 Гц 25 мкТл на уровень NO в клетках в состоянии покоя и активацию синтеза NO при возбуждении гладкомышечных клеток гиперкаліевым раствором. Факт активирующего воздействия электромагнитного поля 8 Гц 25 мкТл на продукцию NO позволяет объяснить ранее установленный феномен подавления K^{+} -индуцированного сокращения гладких мышц.

Ключевые слова: электромагнитное поле, синтез NO, гладкомышечные клетки.

M. Melnyk, PhD stud., V. Martynyuk, DSc, O. Artemenko, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

THE INFLUENCE OF WEAK EXTREMELY LOW-FREQUENCY ELECTROMAGNETIC FIELDS ON NO SYNTHESIS OF SMOOTH MUSCLE CELLS

Effect of extremely low-frequency electromagnetic field 8 Hz 25 μT on NO synthesis in smooth muscle cells of a rats' stomach upon K^{+} -depolarization was discovered. It was shown that electromagnetic field 50 Hz 25 μT doesn't influence on NO synthesis in smooth muscle cells during K^{+} -depolarization and in unstimulated cells. It was demonstrated that electromagnetic field 8 Hz 25 μT doesn't influence on NO level in unstimulated cells, but activate NO synthesis during high potassium induced excitation of the cells. The activating effect of electromagnetic field 8 Hz 25 μT on NO production can explain the previously established inhibition phenomenon of K^{+} -induced contraction of smooth muscles.

Key words: electromagnetic field, NO synthesis, smooth muscle cells.